

学校编码: 10384

分类号_____密级_____

学号: 24520111153415

UDC _____

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

**骨髓间充质干细胞移植治疗放射性肺损伤
的实验研究**

**Study of bone marrow mesenchymal stem cell transplantation in
the treatment of radiation-induced lung injury**

赵兴旺

指导教师姓名: 吴卫真 教授

专 业 名 称: 外科学

论文提交日期: 2014 年 5 月

论文答辩时间: 2014 年 5 月

学位授予日期: 2014 年 月

答辩委员会主席: _____

评 阅 人: _____

2014 年 5 月

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为()课题(组)的研究成果,获得()课题(组)经费或实验室的资助,在()实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

（ ） 1. 经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，
于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

（ ） 2. 不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年 月 日

摘 要

目的：体外分离培养及鉴定 SD 大鼠 BMSCs，研究 BMSCs 对放射性肺损伤的治疗作用。**方法：**1. 体外分离、培养、鉴定 BMSCs；2. 大鼠放射性肺损伤模型的建立；3. 通过检测血清 TGF- β 1、HYP 水平，肺组织 SOD、MDA 含量、PCR 扩增 Sry 基因，研究 BMSCs 对放射性肺损伤的治疗作用。**结果：**1. 运用密度梯度离心法联合细胞贴壁法可获得纯度较高的 BMSCs。BMSCs 高表达 CD29、CD90 表面抗原，低表达 CD34、CD45 表面抗原。BMSCs 可分化为成骨细胞及成脂肪细胞。2. 行全胸部 20Gy 照射，可成功获得放射性肺损伤实验模型。3. 第 1、2w 和 4w 时，A、B 两组大鼠肺系数比较差异有统计学意义 ($P<0.05$)。4. 相比于 B 组，A 组大鼠肺组织炎症渗出较少，肺泡、肺泡壁结构较完整，纤维化程度较轻。5. 与 C 组相比，A 组 2、4w 及 B 组 1、2、4w 时 TGF- β 1 水平差异有统计学意义 ($P<0.05$)；与 B 组相比较，A 组 2w 时 TGF- β 1 水平差异有统计学意义 ($P<0.05$)。与 C 组相比，A、B 两组 1、2、4w 时 HYP 水平差异有统计学意义 ($P<0.05$)；与 B 组相比，A 组 2w 时 HYP 水平差异有统计学意义 ($P<0.05$)。6. 与 C 组相比，A、B 两组 4、6w 时 SOD 活力差异有统计学意义 ($P<0.05$)；与 B 组相比较，A 组 2、4、6w 时血清 SOD 活力差异有统计学意义 ($P<0.05$)。与 C 组比较，A 组 2w 及 B 组 2、4、6w 时 MDA 水平差异有统计学意义 ($P<0.05$)；与 B 组相比，A 组 4、6w 时 MDA 水平差异有统计学意义 ($P<0.05$)。7. 6w 时 A 组的 SPB 表达量高于 B 组，差异有统计学意义 ($P<0.05$)。8. Sry 基因显著表达于损伤的肺组织。**结论：**1. 梯度密度离心法联合细胞贴壁法能成功分离培养出 SD 大鼠 BMSCs。2. BMSCs 对放射性肺损伤具有积极的治疗作用。

关键词：骨髓间充质干细胞；放射；肺损伤

Abstract

Objective: Isolate, culture and identify bone mesenchymal stem cells of rat, to obtain high purity BMSCs, and stability of the biological characteristics, study the BMSCs therapeutic effect on radiation-induced lung injury. **Methods:** 1. Isolate, culture and identify BMSCs. 2. Establish radiation-induced lung injury model in rats. 3. By examining serum TGF- β 1, HYP levels and the SOD, MDA content in lung tissue, PCR amplification of Sry gene, to study the therapeutic effect of BMSCs on radiation-induced lung injury. **Results:** 1. Mesenchymal stem cells were isolated and cultured by combined use of the methods of density gradient centrifugation and cells adherent. BMSCs highly expressed CD29, CD90 surface antigen, low expression of CD34, CD45 surface antigen. BMSCs can differentiate into osteocytes and adipocytes. 2. 20Gy irradiation of the whole line of the chest can be successful radiation-induced lung injury for experimental models. 3. In the 2nd and 4th weeks, A and B groups lung coefficient were statistically significant difference ($P < 0.05$). 4. Compared to group B, group A lung tissue inflammatory exudate fewer alveoli, alveolar wall structure is more complete, lesser fibrosis extent. 5. Compared with group C, in the 1st, 2nd, 4th weeks of TGF- β 1 levels in group A were statistically significant ($P < 0.05$); compared with group B, TGF- β 1 levels of group A in the 2nd week were statistically significant ($P < 0.05$). Compared with group C, in the 1st, 2nd, 4th weeks, HYP levels differences were statistically significant ($P < 0.05$); compared with group B, the 2nd HYP level of group A was statistically significant ($P < 0.05$). 6. Compared with group C, the SOD activity in the 4th and 6th weeks of group A and B were statistically significant ($P < 0.05$); compared with group B, the SOD activity in the 2nd, 4th and 6th weeks of group A were statistically significant ($P < 0.05$). Compared with group C, MDA level differences in the 2nd of group A and the 2nd, 4th, 6th of group B were statistically significant ($P < 0.05$); compared with group B, in the 4th and 6th weeks, MDA levels of group A were statistically significant ($P < 0.05$). 7. In the 6th week, SPB of group A expressed more than group B, the difference was

statistically significant ($P<0.05$).8. Sry gene expression highest in the injury lung tissue. **Conclutions:**1. Combined used the methods of density gradient centrifugation and cells adherent can successfully isolate and culture rat BMSCs, and uniform size, power proliferation, high purity, stable biological characteristics. 2. BMSCs on radiation-induced lung injury has a positive therapeutic effect.

Keywords: BMSCs; Radiation; Lung injury

目 录

中文摘要.....	I
英文摘要.....	II
前 言.....	1
第一章 骨髓间充质干细胞的分离培养与鉴定.....	4
材料与方法.....	4
结 果.....	9
讨 论.....	12
第二章 骨髓间充质干细胞移植治疗放射性肺损伤的实验研究.....	15
材料与方法.....	15
结 果.....	24
讨 论.....	30
结 论.....	35
参考文献.....	36
致 谢.....	41

Tables of contents

Abstract in chinese.....	I
Abstract in English.....	II
Forword.....	1
Chapter 1. SD rat bone marrow mesenchymal stem cells isolated and cultured and identified.....	4
Materials and Methods.....	4
Results.....	9
Discussion.....	12
Chapter 2. Experimental study of bone marrow mesenchymal stem cell transplantation in the treatment of radiation-induced lung injury.....	15
Materials and Methods.....	15
Results.....	24
Discussion.....	30
Conclusions.....	35
References.....	36
Acknowledgement.....	41

前 言

放射性肺损伤（Radiation-induced Lung Injury）最常见于临床胸部肿瘤放射治疗。发病早期以放射性肺炎为主，表现为体温轻度升高，咳嗽、气喘、咳痰等症状；晚期则以持续的体温升高、呼吸困难、肺纤维化等临床表现为主。经过多年的基础实验及临床研究，目前仍缺乏一种既能有效治疗胸部肿瘤，又能避免放射性肺炎的两全其美的治疗手段。

放射性肺损伤的发病机制一直是临床研究的难点，其发病过程复杂，受多种细胞因子及免疫应答机制调控。目前认为，多种细胞因子是导致放射性肺损伤出现早期的放射性肺炎及晚期肺纤维化的病理过程的重要因素。当胸部接受一定剂量的放射线以后，可以激活肺内多种效应细胞激活，使相应的生物细胞因子表达含量增高，参与到组织的损伤-修复过程中。Haase M G 等^[1]研究发现，胸部接受放射治疗后，可增加肺组织内环加氧酶的合成，环加氧酶可通过细胞内信息转到机制，增强前列腺素 E2（PE2）的释放，具有促进早期放射性肺炎发展的作用。自由基的分泌也被认为是介导早期的放射性肺炎的化合物之一，其超强的氧化能力可以使肺组织内的脂质变性，促进成纤维细胞的生成，被认为是导致晚期肺纤维化的重要因素。除了细胞因子的作用外，目前主要研究的内容包括肺 II 型细胞损伤学说、血管内皮细胞受损学说，机体免疫机制损伤等等。

放射性肺损伤病理主要表现为早期的炎细胞、巨噬细胞渗出，至晚期肺间质内胶原纤维增生。具体的病理变化主要分为四个阶段，分别为炎细胞渗出期、肉芽组织增生期、胶原纤维增生期及肺间质纤维化期。白蕴红等^[2]研究发现，大鼠在接受照射以后，一个月内肺组织病理变化主要以渗出为主。照射后两个月，可见肺组织内成纤维细胞增生，肺泡壁完整性遭到破坏，肺间隔增厚。照射后五个月，纤维细胞占据了几乎所有肺组织，肺组织重度纤维化。半年后，肺泡壁完全被胶原纤维取代，肺泡缩小，甚至出现肺泡萎陷，解剖大鼠双肺，可见双肺色白，质韧。由此可见，在经历了早期的放射性肺炎之后，如不及时干预治疗，肺组织的纤维化是不可避免的结局。

早期的放射性肺炎主要以肺组织的炎性渗出为主。临床表现以咳嗽、咳痰、呼吸音加粗、胸部摩擦音，甚者出现呼吸困难及呼吸衰竭，常表现为轻度发热，

体温一般不会超过 39℃。诊断方面,相比于胸部 X 线片,CT 对肺组织的轻微密度改变更为敏感,可以为治疗争取宝贵的时间。CT 常表现为早期的不规则斑片状、锁条状密度增高影或者实变影,中晚期常表现为肺实变,肺小叶间隔及胸膜增厚。结合临床表现及辅助检查,临床上对放射性肺损伤提倡早期、准确的诊断和及时、规范的治疗。

治疗方面,除了吸氧、应用糖皮质激素及抗生素等对症处理方法外,目前尚无特效的治疗手段。无菌性炎症是放射性肺炎与病原微生物感染性肺炎最大的不同,一旦发生无菌性放射性肺炎,除了缺乏针对性的治疗措施外,往往病程较长,且病情比较凶险,肺组织损伤后易形成纤维瘢痕,不易逆转。目前临床上常用的防治药物有如下几种:①阿米福汀(Amifostine)是应用于急性放射性肺损伤最常用药物之一。阿米福汀可经跨膜转运,与镶嵌在细胞膜上的碱性磷酸酶特异性的结合,在细胞内转化为具有活性的二氨基丙基乙基硫醇分子(WR-1065)。冯勤付等^[3]研究发现:对放射性肺损伤的模型大鼠应用阿米福汀,不仅可以增强肺组织对辐射的耐受性,而且还可以增强肿瘤细胞对辐射的敏感性。②己酮可可碱(Pentoxifylline, PTX)是目前临床上较常用的磷酸二酯酶抑制剂,可以提高细胞内第二信使环磷酸腺苷(cAMP)水平,增强 B 淋巴细胞免疫应答水平,从而抑制 TNF- α 等细胞因子的表达。Ozturk 等^[4]研究发现,对 82 例肺癌和食管癌的患者进行双盲实验,结果显示:放射前 1 周预防性应用己酮可可碱的患者,在照射后 2 个月和 3 个月测定血气分析及肺血流灌注情况,显示肺损伤的严重程度明显低于对照组,为 PTX 在放射性肺损伤的应用提供了依据。③干扰素(Interferon, IFN)具有免疫调节、抗肿瘤、及抑制细胞分裂的作用。研究发现,其亚型 β -IFN 和 γ -IFN 具有减缓肺组织纤维化的作用。Joseph AL 等^[5]研究发现,利用阿霉素诱导的肺纤维化模型,通过 IFN 干扰 H2-Fa 基因的合成,发现 MHC II 类抗原转基因的大鼠肺纤维化发生率低于对照组。

近年来,干细胞成为医学界研究的热点,其强大的组织损伤修复能力、调节免疫功能及多向诱导分化的生物学特性,为细胞生物学、临床医学及器官移植等方面的研究提供了理论基础。2007 年,来自美国和日本的两个研究小组,将分化的皮肤成纤维细胞,经过一系列的实验诱导,诱生得到多能干细胞,这一喜人成果分别发表在《Science》和《Cell》。2012 年,来自英国的 John Gurdon 和日

本的 Shinya Yamanaka 以他们在干细胞领域的突出贡献，荣获了当年的诺贝尔生理与医学奖，使得干细胞的研究再掀一股热潮。

通过大量的基础实验及临床试验研究，干细胞的应用在免疫系统疾病、血液系统、心血管系统、呼吸系统等方面取得了一定的成果。Suzuki 等^[6]在猪的心脏缺血再灌注损伤的实验模型中，给予实验组输注同种异体 BMSCs，实验结果表明，BMSCs 可以降低心肌损害程度，增加冠脉血流量，并降低因再灌注损伤所引起的心肌纤维化。用超顺磁性氧化物标记 BMSCs，发现心肌受损部位荧光标记物表达增强，进而说明了 BMSCs 迁移到了损伤的心肌组织，并参与心肌细胞的修复。Otero 等^[7]研究发现，在大鼠脑出血的模型中输注同种异体 BMSCs，研究其内源性神经元修复情况，结果发现，干细胞可以表达并且分泌神经元细胞所产生的细胞因子，为修复脑部神经元的损伤，恢复神经系统同能提供了理论基础。肺损伤的研究方面，周君君^[8]等发现，对放射性肺损伤的小鼠实验模型输注经转化生长因子- α (TNF- α) 刺激的人脐带干细胞，并观察肺组织的病理变化，结果发现，干细胞可以修复损伤肺组织，减少以白细胞介导的炎症渗出过程，并且可以抑制肺组织纤维化程度。由此可见，干细胞的应用或许会在临床诸多疾病的治疗中提供不同的视角，提供新的思路，进而实现更满意的治疗效果。

当然，干细胞特有的生物学优势并非放之四海而皆准，其发挥抗炎的机制，参与免疫调节的功能，修复损伤组织等特性在今后的科学研究中有待进一步探索，我们要知其然，更要知其所以然。由此，本研究初步探讨了 BMSCs 移植对急性放射性肺损伤的治疗作用，并对 BMSCs 的生物学特性进行了初步研究。

第一章 SD 大鼠骨髓间充质干细胞的分离培养和鉴定

骨髓间充质干细胞（BMSCs）具有多向分化潜能，是体外应用比较成熟的成体干细胞之一，因其来源广泛，在体外易于扩增，在体内免疫原性低，并且具有抗炎、修复损伤组织等功能，使干细胞成为了细胞领域、不涉及伦理问题，组织生物学及器官移植领域研究的热点。利用干细胞特有的多向分化、修复损伤组织等特性已得到一系列的研究成果。2012 年，日本东京大学的组织工程医学专家 Takashi Tsuji 等^[9]发现，利用脱发男性的干细胞和正常小鼠的干细胞，经过一系列的诱导实验，可以诱导再生出裸鼠毛囊，长出不同类型的毛发，其重要成果发表在当年的 *Nature Communications* 杂志，这一发现为临床上各种原因引起的脱发治疗提供了较高的研讨价值。放射性肺损伤是临床上胸部肿瘤放射性治疗后常见的并发症，目前仍缺乏一种有效的治疗手段，而干细胞的出现似乎为解决这一难题提供了切入点。本实验主要探讨 BMSCs 对放射性肺损伤的组织修复及治疗作用，因此，能分离获取纯度较高的干细胞是本实验研究的关键所在。本部分通过提取大鼠股骨、胫骨骨髓单核细胞，经过梯度密度离心、淋巴细胞液分离等步骤获得纯度较高的 BMSCs。传代培养后，鉴定其表面抗原分子类型，结果发现其高表达 CD29、CD90，低表达 CD34、CD45。对 P₃ 代细胞加入成骨、成脂诱导剂，BMSCs 可分化出成骨细胞及成脂细胞。说明通过分离、培养和传代后，获得了生物学特性稳定的 BMSCs，为后面的实验研究奠定了基础。

材料与方法

1. 实验动物

选用4-5周健康雄性SD大鼠，质量40-60g，由福州市吴氏实验动物公司提供。实验期间，严格遵守我院实验动物中心管理条例，严格隔离饲养，所有大鼠经免疫检疫合格，饲料为我院严格按照实验动物饲养条例配制而成，确保大鼠以健康的状态进入实验研究。

2. 主要试剂

LG-DMEM培养基	美国HyClone公司
胎牛血清 (FBS)	美国HyClone公司
胰蛋白酶-EDTA	美国HyClone公司
注射用青霉素钠	石家庄制药集团公司
注射用硫酸链霉素	石家庄制药集团公司
甲基噻唑基四唑(MTT)	美国Sigma公司
Percoll分离液	美国Sigma公司
3-异丁基-1-甲基黄嘌呤 (IBMX)	美国Sigma公司
地塞米松	美国Sigma公司
胰岛素	美国Sigma公司
β -甘油磷酸钠	美国Sigma公司
吲哚美辛	美国Sigma公司
维生素C	美国Sigma公司
油红O粉剂	厦门长生生物技术公司
磷酸盐缓冲生理盐水 (PBS)	武汉博士德公司
CD34-PE单抗	美国B C公司
CD45-PE单抗	美国B C公司
CD29-PE单抗	美国B C公司
CD90-PE单抗	美国B C公司

3. 主要仪器设备

超净工作台	苏州净化设备厂
显微镜Olympus IX 70	日本奥林巴斯公司
显微镜	日本奥林巴斯公司
离心机	湖南凯达 TDM-5L 型
CO ₂ 恒温培养箱	美国NAPCO公司
普通冰箱	海尔公司
超低温冰箱	日本DAIDO公司
电子天平	北京生科实验器械公司

电热恒温水浴箱

广州精宏实验设备有限公司

流式细胞仪

美国R D公司

79-1 型磁力热搅拌器

江苏科研器械厂

4. 溶液的配制

4.1 细胞培养液

LG-DMEM细胞培养基+10%小牛血清+硫酸链霉素100 μ g/mL+青霉素钠100U/mL。

4.2 双抗溶液

取100万U硫酸链霉素和100万U青霉素钠，充分溶解在8ml无菌双蒸水。充分震荡摇匀，将以上两溶液混匀制成双抗溶液，注意配比的准确性，为保证双抗溶液性质稳定，配好后置于-20℃冰箱内保存。

4.3 MTT溶液

称取20mg的MTT (5-二苯基四氮唑溴盐)，准备好已平衡至室温的PBS溶液，将MTT与10mlPBS充分混合，充分摇匀，为保证溶液性质稳定，配好后置于4℃冰箱保存。

4.4 成骨样细胞诱导培养液

LG-DMEM细胞培养基+10%小牛血清+ 10^{-7} mol地塞米松+链霉素100 μ g/mL+青霉素钠100U/mL。

4.5 成脂肪样细胞诱导培养液

LG-DMEM细胞培养基+10%胎牛血清+10 μ g/mL胰岛素+200 μ mol吡啶美辛+0.5mmol IBMX溶液。

4.6 2%硝酸银溶液

称取AgNO₃ 3.0g，充分溶解在100ml双蒸水，震荡摇匀，为保持溶液性质稳定，置4℃冰箱内避光保存。

4.7 油红O染液

将0.3mg油红O粉剂与45ml异丙醇溶液充分混合，震荡摇匀，置4℃冰箱内避光保存。应用时，将配置液与蒸馏水按照3: 2的比例混合，充分震荡摇匀，肉眼观察溶液状态，巴氏管吸取底部不溶解的杂质块状物。溶液需在使用前30min配置。

5. BMSCs的分离培养及形态学观察

5.1 单个核细胞的分离

操作台紫外线灯消毒30min, 90%乙醇再次消毒。取60-80g雄性SD大鼠, 处死后无菌条件下完全分离大鼠双后肢皮毛、皮肤, 剪去肌肉, 获取大鼠双后肢。用无菌纱布对双后肢残留的肌肉纤维进行擦磨, 至擦磨干净为止。在盛有无菌生理盐水的培养皿内, 用血管钳夹碎双下肢的干骺端, 力量不可过大, 以免造成单核细胞的破坏丢失。用10ml的无菌注射器, 吸取培养皿内的无菌生理盐水, 对骨髓腔进行冲洗, 以获得单核细胞, 冲洗8-10次。收集冲洗液, 1000rpm离心10min。离心后, 巴氏管吸取底层沉淀物质, 加入5ml低糖培养基, 再加入5ml的Percoll分离液, 利用单核细胞与其它细胞密度不同的特性, 进行梯度密度离心, 2500 rpm离心10 min。离心后可见溶液分为四层, 最底层为冲洗液内有形的杂质层, 小心吸取第二次云雾状物质, 再PBS溶液洗涤两次, 加入10ml低糖培养基, 再次离心, 2500rpm离心10min, 得到的即是单核细胞。

5.2 原代细胞培养

将得到的单核细胞, 加入到25ml无菌透气培养瓶进行培养, 吸取10ul细胞悬液, 用计数板镜下计数。按照之前本实验室内对细胞培养的经验, 以 $2-3 \times 10^5$ 个/瓶的细胞计数加入到25ml的透气培养瓶中, 培养瓶上标记原代细胞, 镜下观察细胞的形态, 置培养箱内培养。24h后显微镜下观察细胞基本情况, 主要观察细胞的形态, 及细胞贴壁的百分比, 为了保证细胞有充分的营养, 24h后即全量更换培养液。此后根据细胞的生长情况, 每48-72h进行一次全培养液更换。

5.3 传代培养

每次传代都需要观察细胞的贴壁及融合面积, 当细胞融合面积 $>80\%$ 的时候, 需要对细胞进行传代培养。紫外线及95%乙醇对超净台充分消毒过后, 丢弃培养瓶内的原细胞培养液, 巴氏管吸尽残留培养液, 无菌生理盐水充分洗瓶两次, 加入2ml的0.25%的胰蛋白酶, 轻轻摇匀, 使胰蛋白酶充分的覆盖在细胞表面。置于细胞培养箱中充分消化5min, 计时器严格计时, 以免胰蛋白酶对细胞消化时间过久而对细胞特性产生影响。5min后观察消化后的细胞形态, 见细胞由原来的梭形变成较均一的球形时, 说明细胞已经消化充分。加入含有10%胎牛血清的完全培养基, 终止细胞的消化。收集细胞悬液, 1000rpm离心10min, 弃上清。再次加入培养基, 重悬细胞。镜下观察细胞形态, 取10ul的重悬液, 计数板上对

细胞进行计数，依据本实验室的细胞培养经验，按照 3×10^5 个/瓶的细胞计数，接种在25ml的透气培养瓶中，置培养箱内培养。24h后观察细胞的贴壁情况，细胞的形态，及伪足情况，并且进行换液。此后每24-48h，根据细胞的生长情况，进行换液，当细胞融合面积 $>80\%$ 时，进行传代培养，按照1:3的传代比例。传代后，培养瓶上明确标记已传代数。

5.4 BMSCs生长曲线测定

选择 P₂、P₃ 代细胞，用 0.25%胰蛋白酶消化，时间控制在 5min 之内，当细胞呈球形悬浮于培养液中时停止消化。将细胞接种于孔板，细胞接种浓度为 1×10^4 /孔，用细胞计数器计数，在每个微孔加入 LG-完全培养基 200 μ l。将孔板用塑料薄膜封闭，放入培养箱内进行培养，24h 后显微镜下观察细胞形态，依据细胞贴壁情况，每 2-3d 换液。细胞贴壁后，加入 30 μ l 的 MTT 溶液，置 37℃细胞培养箱中 3-4h。加入 100 μ l 二甲基亚甲枫，观察块状结晶物溶解情况，摇床上摆 8min，当结晶物充分溶解后，用酶标仪在 490nm 波长处测定细胞的吸光度 OD 值。

6. BMSCs表面抗原鉴定

根据细胞的生长情况，取 P₃ 代细胞进行表面抗原的测定。加入无菌氯化钠充分洗瓶 2 次，洗瓶注意要充分，不可污染瓶口。在每瓶细胞培养液中加入 0.25% 胰蛋白酶 1.5ml 进行细胞的消化，充分消化 5min，使贴壁生长的细胞回缩、脱落，加入含有 10%胎牛血清的低糖培养基终止消化，收集细胞悬液进行离心，1000rpm 离心 10min，计数板进行细胞计数。将细胞悬液加入 EP 管，按照 1×10^6 个/管的浓度加入，每管分别加入与 PE 标记的小鼠抗大鼠 CD34、CD45、CD29、CD90 单克隆抗体 15 μ l，为了观察阴性表达对照，再加入其同型对照抗体各 15 μ l。室温下反应 1h 后，流式细胞仪测定各抗原吸收峰值。

7. BMSCs成骨和成脂诱导

7.1 BMSCs成骨诱导分化

选用P₃代细胞，经0.25%胰蛋白酶消化、高速离心机离心及细胞的重悬，置于培养箱中培养，待细胞贴壁生长，融合面积 $>80\%$ 的时候，对诱导分化的细胞加入成骨诱导剂，对照组细胞继续加入低糖培养基进行培养。每天观察细胞的形

Degree papers are in the “[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)”. Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库